

ヒトグリオーマ細胞株の糖脂質分析と 抗 GM3 および GM2 抗体の反応性の解析

前 田 義 裕

札幌医科大学医学部脳神経外科学講座 (主任 端 和夫 教授)

Analysis of Glycosphingolipid Profile of Human Glioma Cell Lines and of Reactivities of Anti-GM3 and -GM2 Monoclonal Antibodies

Yoshihiro MAEDA

Department of Neurosurgery, Sapporo Medical University School of Medicine
(Chief : Prof. K. HASHI)

ABSTRACT Antibody reactivity toward GM3 and GM2 gangliosides of 10 human glioma and 1 melanoma cell lines was studied. Their ganglioside compositions were analyzed by thin layer chromatography (TLC). The patterns of the ganglioside profiles were classified into three types: 1) GM3-dominant type (KG1C and Mewo (melanoma) cells); 2) GM2-dominant type (H4, A172, T98G, U138MG and U373MG cells); and 3) GM3, GM2-co-dominant type (U87MG, Hs683, SW1088 and U118MG cells). The morphology of the cells in culture was subtyped into polygonal, spindle and nodular. Two cell lines with GM3-dominant type were spindle, while 4 out of the 5 cell lines with GM2-dominant type were polygonal. The antibodies were examined for their reactivity against isolated GM3 and GM2 on TLC plates and those on the cell surface by flow cytometry. GM2 showed more intense staining than GM3 with the same antigen quantity. Cell surface GM3 was only faintly stained as analyzed by flow cytometry. GM3-dominant type, which contains more than 20 nmol of GM3/100 mg wet weight of cells, showed somewhat stronger fluorescence; GM2-dominant type, which has less than 5 nmol of GM3/100 mg wet weight of cells, gave negative staining. The intensity of GM3-staining was not necessarily parallel with the GM3 content. GM2 were more strongly stained with anti-GM2 antibody: GM3, GM2-co-dominant type was more reactive than GM2-dominant type, although the GM2 concentrations did not significantly differ between them. There was no clear relationship between the GM2 content and positivity in flow cytometry, either. In conclusion, the antibody reactivity against chemically isolated GM3 and GM2 was dose-dependent, and GM2 was more reactive with the antibody than GM3; however, the reactivities of those gangliosides on the cell surface were influenced in a more complex way, not only by the concentration of antigens but also by other biological factors such as the co-presence of other ganglioside components.

(Received February 21, 1995 and accepted March 7, 1995)

Key words: Glioma, GM3, GM2, Antibody

1 緒 言

動物種、臓器を問わず広く普遍的に細胞の膜上に存在している糖脂質は、膜を構成する脂質成分の割合としては数%と微量¹⁾であるが、細胞間接着、分化、増殖

等、その機能の解明に近年注目が集まっている。また、細胞の癌化に伴い、細胞表面にある²⁾糖脂質に様々な変化が起こることが明らかになってきた³⁾。今日に至るまで一部の腫瘍、たとえばメラノーマや肺小細胞癌、神経芽細胞腫などでは様々な糖脂質が腫瘍関連抗原とし

で同定されている⁴⁾。

シアル酸を含むスフィンゴ糖脂質であるgangliosideは他の細胞と較べて神経系細胞に多量に存在しており、近年脳神経外科領域においても、それらの臨床応用への可能性を求め、多くの基礎的研究が進められている。脳神経外科領域で期待されているgangliosideの生理作用および特徴として、1) 外傷後や末梢、中枢神経系の虚血病変からの回復促進および脳浮腫の軽減(実験動物において)、2) 樹状突起の形成を促進、3) 神経外胚葉系の腫瘍抗原としての免疫療法への応用、が考えられている⁵⁾。中枢神経系の難治性腫瘍であるグリオーマでは、その治療法として手術による摘出、放射線療法、抗腫瘍剤を用いた化学療法、サイトカインを用いた免疫療法など集学的治療が行われるにもかかわらず、5年生存率は30%強と不良である⁶⁾。グリオーマにおいて、腫瘍に特異的に発現している糖脂質を見いだすことができれば、それを抗原とした免疫療法への可能性が開けるであろう。あるいは個々の腫瘍の糖脂質の組成を分析し、それに応じたモノクローナル抗体を用いた治療も可能となるであろう。

本研究ではヒトグリオーマ細胞株10種およびメラノーマ細胞株1種を用い、それらの糖脂質組成を解析した。また抗糖脂質抗体の、精製抗原と細胞膜上抗原に対する反応性について検討した。

2 実験方法

2.1 細胞

ヒトグリオーマ細胞株H4, SW1088, Hs683, U87MG, U118MG, U373MGはATCCより、T98G, A172, KG1CはJCRB細胞バンクより、またメラノーマ細胞株MewoはJCRB細胞バンクより入手した。細胞培養は10%ウシ胎児血清添加Dulbecco変法Eagle培地にて5%CO₂, 37°Cの条件下でφ15 cmの培養皿にて培養した。細胞が隙間なく密になった時点でセルスクレイパーを用いて細胞をかき取り、湿重量379-1043 mgを回収した。

2.2 糖脂質の抽出

混合溶媒の比は全て容量比で示す。

得られた細胞にクロロホルム/メタノール/水(以下CMWと略記)=4:8:3を10 ml加えて室温で一晩、総脂質を抽出した。この操作を2回行い、さらに10 ml加えて37°C, 2時間の条件で抽出した。リン脂質を含むグリセロ脂質を弱アルカリ処理により分解後、ゲル濾過カラム (bed volume, 20 ml; Sephadex LH-20, Pharmacia, Sweden)にて総脂質を脱塩し、イオン交換

カラム (bed volume, 1 ml; DEAE-Sephadex A-25, acetate型, Pharmacia, Sweden)にて中性画分と酸性画分を得た。酸性画分をさらに前述のカラムで再度脱塩した。

2.3 薄層クロマトグラフィー (TLC)

酸性糖脂質画分を高性能薄層クロマトグラフィー (HPTLC) プレート (Merck, Silica Gel 60, Germany) 上で展開した。糖脂質標準物質としてGM3 (コスモバイオ), GM2 (Bio Carb Chemicals, Sweden) を使用した。展開溶媒はCMW (0.2%CaCl₂) = 55:45:10を用い、オルシノール-硫酸試薬にて発色(100°C, 10分)させた。

2.4 合成酵素活性測定

GM3合成酵素、およびLc₃Cer合成酵素活性の測定は、Kawanoら⁷⁾の方法に従った。ヒトグリオーマ細胞株10種とメラノーマ細胞株1種を隙間なく密(各φ15 cm×1)になるまで培養した。トリプシン-EDTA (GIBCO BRL, U. S. A.)にて細胞を回収し、使用時まで-80°Cで冷凍保存した。各細胞をリン酸緩衝溶液 (PBS) にて最終容量1 mlとし、超音波粉碎装置にて細胞を破壊したのち、遠心 (500×g, 10分) して上清画分 (細胞抽出液) を酵素源とした。

蛋白濃度はBCA試薬 (Pierce Chemical Co) を用いて測定した。

活性測定はduplicateにて行い、controlは0-timeあるいは糖脂質受容体を加えないものを用いた。酵素反応終了後、生成物を分離するために逆相クロマトグラフィーカラム (Varian, Bond Elut C₁₈) を用いた。

2.4.1 GM3合成酵素

最終容量50 μl中、1 mM LacCer, 50 mM Cacodylate/HCl (pH 6.6), 5 mM MgCl₂, 0.5 mM CMP-[³H] NeuAc (50 nCi) (NEN Research Products, U. S. A.), 0.5% Lubrol PX, 細胞抽出液25 μlを含む溶液を37°C, 2時間反応させた。冷H₂Oを950 μl加え冷却して反応を停止させ、1×10⁴ rpm, 1分遠心し、上清を800 μlとり、前述のC₁₈カラムに添加した。カラムを20 mlのH₂Oで洗浄後、1 mlのメタノールと5 mlのCMW=60:30:4.5にて、[³H]ラベルされた生成物をシンチレーションバイアルに溶出した。放射活性は、5 mlのシンチレーションカクテルを加え、液体シンチレーションカウンター (Beckman, LS6000LL)にて測定し、生成糖脂質量の絶対量を求めた。

2.4.2 Lc₃Cer合成酵素

最終容量50 μl中、1 mM LacCer, 50 mM

Cacodylate/HCl (pH 6.6), 5 mM MgCl_2 , 5 mM MnCl_2 , 0.5 mM UDP- ^3H GlcNAc (65 nCi) (NEN Research Products, U. S. A.), 0.5% Lubrol PX, 細胞抽出液 25 μl を含む溶液を 37°C, 2 時間反応させた。以後の操作は GM3 合成酵素の場合と同様に行い, 放射活性を測定し, 生成糖脂質量の絶対量を求めた。

2・5 糖脂質代謝回転

薄層クロマトグラフィーの酸性糖脂質パターンから, KG1C, H4, Hs683, SW1088, A172 の 5 種類を選び出し, これらの細胞の放射標識 Glucosamine のガングリオシドへの取り込みをみた。方法は Kobayashi ら⁸⁾の方法の変法にて行った。

ϕ 15 cm の培養皿を用い, 培養開始時, ^3H -D-GlcNH $_2$ ·HCl (Moravsek Biochemicals, U. S. A.) を 50 μCi 各培養皿に添加した。生細胞数 4×10^6 個で培養を開始し, 5 日間培養したのちトリプシン-EDTA (GIBCO BRL, U. S. A.) にて細胞を回収し, 前述のごとく糖脂質を抽出した。各細胞より抽出した糖脂質をイオン交換カラムにて酸性糖脂質を分離し, 薄層クロマトグラフィー (TLC) プレートにて CMW=60:35:8 で展開し, X-ray フィルムにてオートラジオグラフィーを行った。

2・6 免疫染色法

免疫染色は, 神奈木ら⁹⁾の方法の変法にて行った。酸性糖脂質画分を HPTLC プレート (Merck, aluminium Silica Gel 60, Germany) 上で展開溶媒 CMW (0.2% CaCl_2) = 55:45:10 を用い, 展開した。プレートを 0.1% となるようにポリイソブチルメタクリレートを加えたヘキサン中に 75 秒浸し, ドライヤーで乾燥させた。さらにシリカゲル入りのデシケーターにて一晩乾燥させた。次にプレートを 1% ウシ血清アルブミン (BSA) 入りの PBS 中で 1 時間ブロッキングを行った。一次抗体に抗 GM3 抗体としてモノクローナル抗体 M2590¹⁰⁾ (非還元末端の NeuAc α 2-3Gal β -を認識する。) (コスモバイオ) 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を, 抗 GM2 抗体として GM2 に特異的なモノクローナル抗体 GMB28¹¹⁾ (都臨床研, 田井直先生より供与していただいた。) を用い, 室温にて 1 時間反応させた。一次抗体反応後, PBS にて十分に洗浄し, 1% BSA in PBS 中で 15 分ブロッキングを行った。次に, 二次抗体に Biotin-conjugated goat α mouse Ig (Cappel) を 100 倍希釈で用い, 室温にて 1 時間反応させた。二次抗体反応後, PBS にて十分に洗浄し, 1% BSA in PBS 中で 15 分ブロッキングを行った。ABC エリートキット (VECTASTAIN, U. S. A.)

を 100 倍希釈にて反応させた。発色にはジアミノベンチジンをを用いた。

2・7 フローサイトメトリー

T 75 cm^2 カルチャーフラスコ (Falcon, NJ) を用い, 生細胞数 1×10^6 個で培養を開始した。細胞の状態がほぼ密になった時点で順次, トリプシン-EDTA (GIBCO BRL) 5 倍希釈にて回収し, 間接蛍光抗体法にて解析した。一次抗体に M2590 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, GMB28 はハイブリドーマ培養上清を 50 μl 用い, 室温にて 1 時間反応させ, 二次抗体に FITC goat α mouse Ig (Cappel) を 100 倍希釈にて 50 μl 用い, 室温にて 1 時間反応させた。0.5% ホルムアルデヒド液で固定し, フローサイトメーター (FACScan, Becton Dickinson, CA) にて 1×10^4 個の細胞をカウントし, 解析した。

2・8 デンシトメトリー

酸性糖脂質画分を HPTLC プレート (Merck, Silica Gel 60, Germany) 上で展開した。展開溶媒は CMW (0.2% CaCl_2) = 55:45:10 を用い, レゾルシノール-塩酸試薬にて発色させた。発色させたプレートをデンシトメーター (Dual-Wavelength TLC Scanner, Shimadzu) を用いて, 580 nm 波長光にて測定した。

2・9 シアル酸定量

シアル酸定量はレゾルシノール-塩酸法¹²⁾変法にて行った。抽出した各細胞株の酸性糖脂質を細胞湿重量 100 mg 相当分, テフロンコーティングしたふた付きスピッツにとって溶媒を取り除き, レゾルシノール-塩酸試薬を 100 μl 加えた。100°C, 30 分加熱後, 酢酸ブチル-ブタノール (85:15) 150 μl を加えて攪拌し, 800 \times g, 5 分遠心後上清をとり, 分光光度計 (UV-1200, Shimadzu) を用い, 580 nm 波長光にて測定した。標準試料より検量線を作成し, 脂質結合シアル酸量 (lipid bound NANA/mg protein あるいは湿重量 100 mg) を求めた。

3 実験結果

3・1 酸性糖脂質組成

薄層クロマトグラフィーの結果から, 全ての細胞株の酸性糖脂質組成はガングリオ系ガングリオシドである GM3, GM2 が主であるが, ネオラクト系ガングリオシドであるシアリルパラグロボシド (SPG) も主要ガングリオシドのひとつであることが認められた (Fig. 1)。デンシトメトリーの結果から GM3/GM2 比 10.0 以上を GM3 dominant グループ (KG1C, Mewo), 0.5 以下のものを GM2 dominant グループ (H4, U138MG,

U373MG, T98G, A172), 0.5-10 の間に位置するものを GM3, GM2 co-dominant グループ (U87MG, Hs683, SW1088, U118MG) とした。レゾルシノーラー塩酸法による糖脂質定量と TLC のデンシトメトリーの

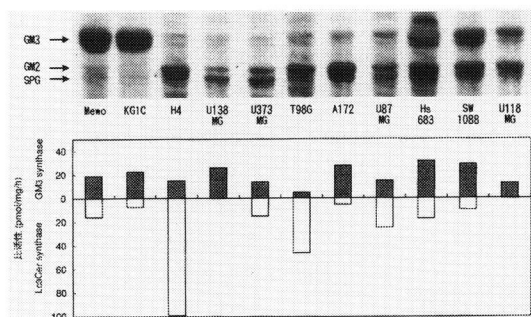


Fig. 1 Thin layer chromatograms of gangliosides and specific activities of GM3 and Lc₃Cer synthase in 10 glioma and 1 melanoma cell lines. Gangliosides equivalent to 100 mg in wet weight of cells were applied on a HPTLC plate and were developed with C/M/W (0.2%CaCl₂) = 55 : 45 : 10 (v/v/v). Chromatogenesis was done with orcinol-sulfuric acid reagent. Specific activities of the synthetic enzymes were shown below TLC and were expressed as pmol/mg protein/h of synthesized products. Shaded bars (■) and open bars (□) indicate GM3 and Lc₃Cer synthase activities, respectively.

結果から, GM3, GM2 それぞれの絶対量をモル数および抗原数で表した (Table 1, 2).

3・2 細胞形態

今回用いた細胞株を位相差倒立顕微鏡で観察した結果, 形態上次の 3 タイプに分類可能であった. H4, T98G, U373MG, Hs683, U118MG, A172 を多角形をした Polygonal タイプ, KG1C, U138MG, SW1088, Mewo を紡錘形をした Spindle タイプ, U87MG を結節を形成するような Nodular タイプとした (Fig. 2a, b). GM3 dominant グループでは KG1C, Mewo いずれも Spindle タイプであり, GM2 dominant グループでは U138MG を除き 4/5 種の細胞が Polygonal タイプであった. GM3, GM2 co-dominant グループでは細胞形態はまちまちであった.

3・3 GM3, Lc₃Cer 合成酵素活性

ガングリオ系ガングリオシドとラクト・ネオラクト系ガングリオシドへの生合成の調節は, ラクトシルセラミド (LacCer) を基質とした 2 種の合成酵素の活性比によって行われている. 合成酵素活性の結果は Fig. 1 の棒グラフに示すごとくである. 薄層クロマトグラフィー (TLC) のパターンと対比させると, 10 種のグリオーマ細胞のうち 7 種までが GM3 合成酵素優位であり, グリオーマ細胞におけるガングリオ系ガングリオシドの優位性が支持された. しかし TLC 上ネオラクト系ガング

Table 1 GM3 content and reactivity with M2590.

Cell line	GM3 content ^{a)}					TLC immuno- ^{g)} staining	FACS (% of positive)
	μg/10 ⁷ cells ^{b)}	fmol/cell ^{c)}	no./cell (×10 ⁸) ^{d)}	nmol/mg protein ^{e)}	nmol/100 mg ^{f)}		
Mewo	3.62	1.17	7.04	8.92	28.42	+++	5.63
KG1C	3.45	1.12	6.74	34.75	42.71	++++	4.77
H4	0.30	0.10	0.60	0.66	0.82	++	0.76
U138MG	0.30	0.10	0.60	0.70	1.04	±	0.04
U373MG	0.80	0.26	1.57	1.07	1.83	+	0.12
T98G	1.06	0.34	2.05	1.23	2.99	+	0.17
A172	1.04	0.34	2.05	1.21	3.13	++	1.84
U87MG	0.83	0.27	1.63	1.22	2.54	++	2.61
Hs683	4.33	1.40	8.43	6.12	17.51	+++	0.79
SW1088	5.20	1.68	10.11	5.25	11.82	++	1.82
U118MG	2.05	0.66	3.97	2.56	6.22	++	3.04

^{a)} GM3 content was calculated from the results of quantification of the total lipid-bound sialic acid with resorcinol-HCl method and densitometric analysis of TLC visualized with resorcinol-HCl reagent.

^{b)} Lipid-bound sialic acid (μg)/10⁷ cells as determined by resorcinol-HCl method.

^{c)} The quantity of GM3 was calculated from molal analysis of sialic acid and was expressed as fmol/cell.

^{d)} The number of GM3 molecules on the cell was calculated from c).

^{e)} GM3 content was expressed by per mg protein basis as determined by the protein assay.

^{f)} GM3 content was expressed as nmol/100 mg wet weight of cells.

^{g)} The intensity of staining was graded from none (−) to very strong (++++).

Table 2 GM2 content and reactivity with GMB28.

Cell line	GM3content ^{a)}					TLC immuno- ^{g)} staining	FACS (% of positive)
	$\mu\text{g}/10^7\text{cells}^{\text{b)}$	$\text{fmol}/\text{cell}^{\text{c)}$	$\text{no.}/\text{cell}(\times 10^8)^{\text{d)}$	$\text{nmol}/\text{mg protein}^{\text{e)}$	$\text{nmol}/100\text{ mg}^{\text{f)}$		
Mewo	0	0	0	0	0	+	2.77
KG1C	0	0	0	0	0	—	0.17
H4	3.68	1.19	7.16	8.25	10.19	++++	9.69
U138MG	0.78	0.25	1.51	1.84	2.73	++	4.43
U373MG	2.30	0.74	4.45	3.10	5.29	+++	1.13
T98G	7.16	2.31	13.91	8.28	20.13	+++	6.79
A172	6.84	2.25	13.55	8.08	20.97	++++	3.96
U87MG	1.43	0.46	2.77	2.11	4.39	+++	16.70
Hs683	5.46	1.76	10.60	7.72	22.06	+++	6.07
SW1088	4.68	1.51	9.09	4.73	10.64	+++	11.57
U118MG	2.76	0.89	5.36	3.45	8.40	++	23.35

^{a)} GM2 content was calculated from the results of quantification of the total lipid-bound sialic acid with resorcinol-HCl method and densitometric analysis of TLC visualized with resorcinol-HCl reagent.

^{b)} Lipid-bound sialic acid (μg)/ 10^7 cells as determined by resorcinol-HCl method.

^{c)} The quantity of GM2 was calculated from molal analysis of sialic acid and was expressed as fmol/cell.

^{d)} The number of GM2 molecules on the cell was calculated from c).

^{e)} GM2 content was expressed by per mg protein basis as determined by the protein assay.

^{f)} GM2 content was expressed as nmol/100 mg wet weight of cells.

^{g)} The intensity of staining was graded from none (—) to very strong (++++).

リオシドの優位と見られる U138MG で Lc_3Cer 合成酵素活性が認められず、反対に明らかにガングリオ系が優位である H4, T98G において Lc_3Cer 合成酵素活性が GM3 合成酵素の 5 倍以上も亢進しており、限られた合成酵素活性の範囲のみでは細胞に発現されているガングリオシドの種類や量を説明するのに十分ではなかった。

3・4 細胞への放射標識 D-Glucosamine の取り込みについて

D-Glucosamine は代謝を受けノイラミン酸に生合成され糖脂質に付加される。D-Glucosamine の放射性標識により、一定時間における糖脂質の合成速度を標識された糖脂質を抽出、オートラジオグラフィーを行うことによって知ることができる。GM3 dominant グループから KG1C, GM2 dominant グループから H4, A172, GM3, GM2 co-dominant グループから Hs683, SW1088 を代表として用いた結果、SW1088 で GM3 の標識が通常の TLC パターンと比して低下していた以外、TLC で見られるガングリオシド量と生合成速度はほぼ一致していた (Fig. 3)。

3・5 免疫染色

M2590 を用いた GM3 ガングリオシドの免疫染色では、U138MG では染色の強さを土としたが、その他の細胞においては全て反応が陽性であった (Fig. 4)。ま

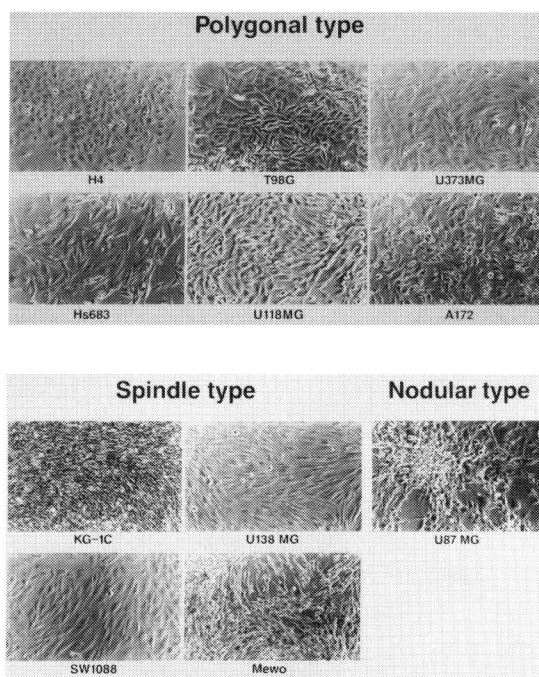


Fig. 2a, b Morphological appearances of 11 cell lines as observed with an inverse phase-contrast microscope ($\times 150$). The morphology of the cells was subtyped into spindle, polygonal and nodular.

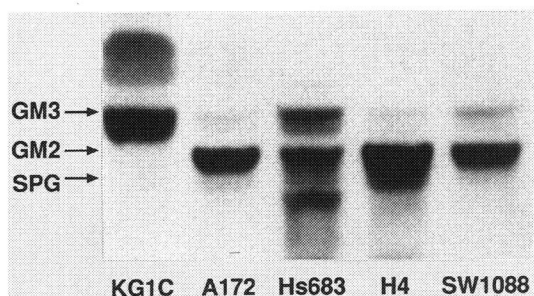


Fig. 3 Autoradiography of gangliosides of glioma cells. The cells in culture were pulsed for 5 days with [^3H]-glucosamine, which was incorporated into neuraminic acid of gangliosides. Labeled gangliosides were extracted and developed on a HPTLC, which was subjected to autoradiography.

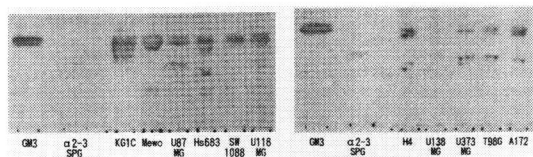


Fig. 4 TLC immunostaining of GM3 with M2590 antibody. Gangliosides equivalent to 20 mg of wet weight of cells were developed on a HPTLC aluminium plate, which was reacted with M2590 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). SPG standard was included in the reaction because of the cross-reactivity of M2590 toward this ganglioside. No staining was observed with GM2 standard (data not shown).

た U87MG, Hs683, U118MG, H4, U138MG, U373MG, T98G, A172 においては、通常の GM2 よりわずかに低い高さのバンドに反応があり、このバンドが SPG であることが確認されている。これは M2590 の反応特異性¹⁰⁾ から矛盾しない結果である。

GMB28 を用いた GM2 ガングリオシドの免疫染色では、KG1C を除く全ての細胞において非常に強く反応が陽性であった (Fig. 5)。反応の強さを (－) ～ (++++) の 6 段階で大まかに評価した結果では、TLC 上の抗原量と抗体反応性の強さはほぼ一致する結果であった。GMB28 は M2590 よりも同量の抗原に対し強い反応を示していた。

3・6 フローサイトメトリー

結果は Fig. 6, 7 に示すごとくである。M2590 を用いたフローサイトメトリーのパターンでは、GM3 量 20 nmol/100 mg 細胞湿重量以上の Mewo, KG1C で陽性率 5% 前後を示したが、5 nmol/100 mg 細胞湿重量

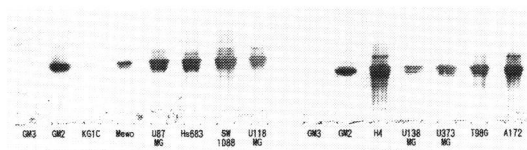


Fig. 5 TLC immunostaining of GM2 with GMB28 antibody. TLC was carried out in the same manner with GM3 staining. GMB28 was used as culture supernatant of the hybridoma.

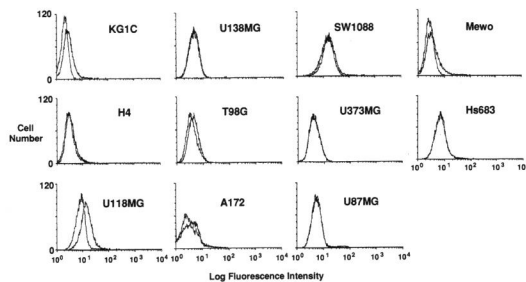


Fig. 6 Flow cytometric analysis of 11 cell lines stained with indirect immunofluorescence method with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of M2590 antibody. Cell number was plotted on the ordinate, while fluorescence intensity was on the abscissa. For details, see Material and Methods.

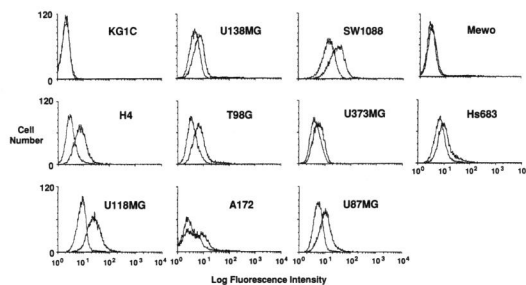


Fig. 7 Flow cytometric analysis of 11 cell lines stained with indirect immunofluorescence method with GMB28 antibody. For details, see Material and Methods.

以下のものでは陽性率 1% 以下で、反応は陰性と判断された。5–20 nmol/100 mg 細胞湿重量の中等量の GM3 を含む細胞では、反応は弱いながら両者の中間の陽性率であった。

GMB28 を用いたフローサイトメトリーでは、GM3 dominant グループである KG1C を除き、全細胞株で陽性細胞が認められ、M2590 に比し全般に強い反応性を認めた。GM3, GM2 co-dominant グループが高い陽性率を示す傾向があり、GM2 dominant グループに比し

GM2 含量に大差なくとも、co-dominant グループでの陽性率は高かった。しかしながら GM2 の絶対量と陽性率は必ずしも一致せず、GM3 でみられたような抗体反応性の閾値が GM2 の絶対量からは得られなかった。

4 考 察

細胞の腫瘍化に伴った糖脂質糖鎖の変化に関する研究は主に糖鎖構造の変化を臨床上の診断や免疫療法への応用を目的として行われている²⁻⁴⁾。脳腫瘍、ことにグリオーマにおいての糖脂質分析については、細胞株、摘出標本を含め数多くの報告がなされているが、基本的には糖脂質成分の量的変化である¹⁷⁻¹⁹⁾。正常脳のガングリオシド成分は GM1, GD1a, GD1b, GT1b が全体の約 70% を占め、糖鎖構造の短い GM3, GM2, GD3, GD2 はそれぞれ約 5% を占めるにすぎない¹⁶⁾。グリオーマにおけるガングリオシドは GM3, GM2, GD3, GD2, SPG が主要な構成物であるとする報告が多い^{13,15,17-19)}。今回の実験結果でも全て、GM3, GM2, SPG の組み合わせが主であった。摘出組織よりの糖脂質と組織上の悪性度との関係では悪性度が高いものに GD3 の増加がみられ¹⁹⁾、良性グリオーマでは正常脳に近いガングリオシド組成をしめすが GM2 と GD2 の増加がみられると報告されている¹⁴⁾。Fredman らは sialyllactotetraosylceramide (3'-isoLM1) が grade III, IV の悪性グリオーマ 14 例中全例に認められ、グリオーマに特徴的のガングリオシドであると報告している¹⁸⁾。グリオーマ細胞および組織におけるガングリオシドは前述のごとく、ガングリオ系ガングリオシド (GM3, GM2, GD3, GD2) が優位であるが、ラクト・ネオラクト系ガングリオシド (SPG, 3'-isoLM1) も含まれている。この両者への生合成系の分岐点は、LacCer を基質とし GM3 あるいは Lc₃Cer が合成される点である (Fig. 8)。両合成酵素の活性をみると、GM3 合成酵素が優位である細胞が多く、ガングリオ系ガングリオシドの優位性が酵素活性からも支持された。

本実験では GM3/GM2 比から細胞株を 3 群に分類した。今回用いたグリオーマ細胞 10 種全てにおいて TLC 上 GD3 が認められず、GM3 から GD3 へと向かうガングリオ系ガングリオシド b-経路の合成活性がほとんど認められなかったため、GM3/GM2 比は GM3 から GM2 へ転換される GM2 合成酵素 (Galtransferase) および GM2 分解酵素 (Hexosaminidase) の活性化により調節を受けているものと考えられる²⁰⁾。一定期間内 (5 日間) における糖脂質の代謝回転をシアル酸のラベリングによって評価した結果では、TLC でみられるガン

リオシド量と代謝速度はほぼ一致する結果であり、GM3/GM2 比で表された TLC 上のバンドの強さの比はガングリオシドの生合成と分解の動的なバランスの上で成り立っていることが裏付けられた。

今回用いた細胞株の細胞形態と糖脂質発現パターンをみると、GM3 dominant グループは紡錘形を示し、GM2 dominant グループは多角形を示す傾向がみられた。これが有意な関係か現時点では判断できないが、ガングリオシド組成と形態についての関係はグリオーマ細胞においても既に指摘されており、継代培養を続けた後にもとの形態を保っている細胞ではガングリオシド組成も変化が少なく、細胞突起が短くなり上皮系細胞へと形態変化を示した細胞では、ガングリオシド総量および長鎖ガングリオシドの減少が認められている²¹⁾。ガングリオシドが形態に影響を及ぼし得るのは、細胞間接着細胞-細胞外マトリックスとの接着との関わりが考えられるほかに、ガングリオシドが細胞内の中間フィラメントと共在することも認められており²²⁾、細胞骨格との直接の関わりも予想される。

本実験は、グリオーマの GM3, GM2 ガングリオシドに対する抗体反応性の解析が主目的である。まず細胞からの抽出抗原 (GM3, GM2) に対する抗体反応性を TLC 上で半定量的に解析した。GM3, GM2 ともに抗原量にほぼ依存した反応の強さが得られたが、GM3 に対する反応性は GM2 に比して全般に低く、これは GM3 に対する他のモノクローナル抗体である GMR6 を用いても同様の結果であったため (データ未発表)、GM3 自体の抗原性が本来 GM2 に比して低いためと考えられた。

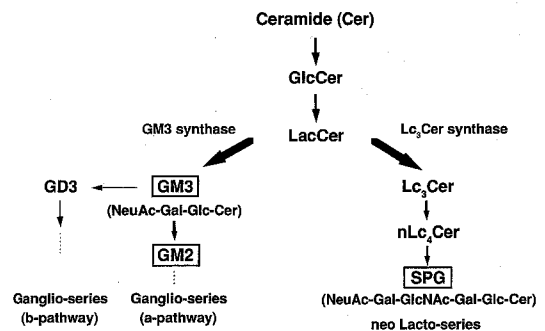


Fig. 8 Metabolic chart of ganglioside synthesis. GM3 and GM2 are synthesized from LacCer with GM3 synthase, while SPG is synthesized from LacCer with Lc₃Cer synthase. The ratio between the two enzymes determines the predominance of metabolic flow to either series of gangliosides.

このことはGM3あるいはGM2でマウスを免疫した際の血清抗体価によっても認められており、免疫された10系統のマウス全種で、GM3に対する抗体価は抗GM2抗体価よりも常に低値であったと報告されている²³⁾。

フローサイトメトリーで得られた細胞表面上での抗体反応はより複雑であった。細胞上のGM3およびGM2の抗原量とFACS陽性率をみると、GM2の反応性はGM3に比して抗原量に大差なくとも、やはり全般に陽性率が高かった。しかしながらGM3、GM2ともに、特にGM2においては、その絶対量が必ずしもFACS陽性率と相関を示すものではなかった。Noresら²⁶⁾は、ヒトメラノーマや神経芽細胞腫、Burkittリンパ腫などのGM3を用いてM2590との反応性を調べたが、細胞1gあたり0.2-0.3 μmol のGM3 (20-30 nmol/100 mg)が存在しなければ反応が見られず、10 nmol/100 mg以下では無反応で、反応に必要な抗原量の閾値を認めている。本実験では、Mewo, KG1CのGM3がそれぞれ28 nmol, 42 nmol/100 mgと閾値を越して11種の細胞中では高い陽性率を示しており、5 nmol/100 mg以下で無反応となっていることから、基本的にNoresらの結果を支持するものであった。しかしながらGM3、GM2 co-dominant グループの多くは陽性および陰性閾値の中間値のGM3量を持ち、これらのFACS陽性率は必ずしも抗原量に依存したものではなかった。GM3の反応性については、Lloydら²⁵⁾が7種のメラノーマ細胞株を用いてM2590とGM3との反応性を調べている。全ての細胞株でGM3の存在が認められたが、M2590と反応が見られたのはGM3、1種類のみからなる1細胞株のみであり、50%以上がGM3であっても他のより複雑なガングリオシドが存在すると反応を検出することができなかった。以上から彼らは、ガングリオシドの反応性を規定するものは糖鎖構造の複雑さであると結論づけている。グリオーマ細胞はGM3抗体に対する反応性が全般に低く、単に共存する他のガングリオシドの影響だけで反応性を説明するのは困難である。またGM2抗体に対する反応性はGM2 dominant グループよりもGM3、GM2 co-dominant グループで強くみられ、グリオーマに関してはこのような単純明快な結論は得られない。

以上のように糖脂質を抗原とした抗体の反応性が様々で、一元的に説明できないのは数多くの研究者達が報告するところである。化学的にある量の糖脂質が存在するのに、それに対して免疫反応が起こらない矛盾をHakomoriらは、細胞膜上糖脂質抗原の

“Crypticity”と表現した^{26,27)}。このCrypticityを説明する因子として先に述べた共存するガングリオシドの影響のほか、セラミドの構造²⁷⁾や近接する複合糖質のシアル化の程度²⁸⁾、細胞周期²⁹⁾、細胞密度³⁰⁾、などが報告されている。隣接する蛋白質によってマスクされているとの報告³¹⁾もあるが、今回使用したグリオーマ細胞のFACS陽性率はトリプシン処理の有無によりあまり影響を受けなかったことから、この関与は少ないものと考えられる。

抗糖脂質抗体の細胞膜上での反応にはこうした様々な因子が関わっているが、これらが総合的に、複雑に絡み合っているグリオーマ細胞の抗体反応性を規定しているものと思われ、例えば前述のメラノーマ細胞とは異なった特徴を形づくっているものと想像される。我々は既に特定のグリオーマ細胞では細胞密度がGM3の抗体反応性に大きく関与していることを見出ししており(データ未発表)、今後は抗体の反応性を規定する因子を具体的に明らかにしていき、より効率のよい免疫療法を確立したいと考えている。

5 結 語

ヒトグリオーマ細胞株のGM3、GM2 ガングリオシドに対する抗体反応性について検討した。

1) 酸性糖脂質は主にGM3、GM2、SPGより成り、GM3/GM2比より細胞を3群に分類した。

2) GM3 dominant グループは紡錘形で、GM2 dominant グループは多角形が多く、GM3、GM2 co-dominant グループでは両者、あるいは結節型と様々な形態を取り、細胞形態と糖脂質組成の関連が示唆された。

3) 精製抗原(GM3、GM2)の抗体反応性は抗原量依存性であったが、細胞上での反応は必ずしも抗原量と相関を示さなかった。この傾向は特にGM2において強くみられた。

4) GM2はGM3よりも精製抗原および膜上抗原としてともに抗体反応性が高かった。

謝 辞

稿を終えるにあたり御指導と御校閲を賜りました札幌医科大学脳神経外科学講座端和夫教授に深甚なる謝意を表します。また終始研究の御指導と御校閲を賜りました札幌医科大学脳神経外科学講座八巻稔明医師に心から感謝いたします。また貴重なる標準糖脂質を御提供くださり、実験に対し御指導、御助言いただきました札幌医科大学化学教室佐佐伸省教授に心から

感謝いたします。

参考文献

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD, 大隅良典, 小倉明彦, 桂黠, 丸野内 隼. 細胞の分子生物学 第2版 東京, 教育社, 1990, 276-283.
- Hakomori S. Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation, and oncogenesis. *Annu Rev Biochem* 1981, 50: 733-764.
- 瀧 孝雄, 松本 亮. 糖脂質糖鎖のがん性変化とモノクローン抗体. *生化学* 1989, 61: 177-193.
- Hakomori S. Aberrant glycosylation in cancer cell membranes as focused on glycolipids: overview and perspectives. *Cancer Res* 1985, 45: 2405-2414.
- Rodden FA, Wiegandt H, Bauer BL. Gangliosides: the relevance of current research to neurosurgery. *J Neurosurg* 1991, 74: 606-619.
- 脳腫瘍全国統計委員会編. 脳腫瘍全国集計調査報告 vol. 8. 東京, 1993, 72-73.
- Kawano M, Honke K, Tachi M, Gasa S, Makita A. An assay method for ganglioside synthase using anion-exchange chromatography. *Anal Biochem* 1989, 182: 9-15.
- Kobayashi T, Honke K, Kamino K, Sakakibara N, Gasa S, Miyano N, Tsukamoto T, Ishizuka I, Miyazaki T, Makita A. Sulfolipids and glycolipid sulfotransferase activities in human renal cell carcinoma cells. *Br J Cancer* 1993, 67: 76-80.
- 神奈木玲児. 糖脂質抗原の薄層クロマトグラフプレート上での検出法 -TLC-immunostaining 法-. 免疫実験操作 1984, 第13巻: 4193-4208.
- Hirabayashi Y, Hamaoka A, Matsumoto M, Matsubara T, Tagawa M, Wakabayashi S, Taniguchi M. Syngeneic monoclonal antibody against melanoma antigen with interspecies cross-reactivity recognizes GM3, a prominent ganglioside of B16 melanoma. *J Biol Chem* 1985, 260: 13328-13333.
- Kotani M, Ozawa H, Kawashima I, Ando S, Tai T. Generation of one set of monoclonal antibodies specific for a-pathway ganglio-series gangliosides. *Biochim Biophys Acta* 1992, 1117: 97-103.
- Svennerholm L. Quantitative estimation of sialic acids. *Biochim Biophys Acta* 1957, 24: 604-611.
- Traylor TD, Hogan EL. Gangliosides of human cerebral astrocytomas. *J Neurochem* 1980, 34: 126-131.
- Jennemann R, Rodden A, Bauer BL, Mennel HD, Wiegandt H. Glycosphingolipids of human gliomas. *Cancer Res* 1990, 50: 7444-7449.
- Shinoura N, Dohi T, Kondo T, Yoshioka M, Takakura K, Oshima M. Ganglioside composition and its relation to clinical data in brain tumors. *Neurosurgery* 1992, 31: 541-549.
- Ueno K, Ando S, Yu RK. Gangliosides of human, cat, and rabbit spinal cords and cord myelin. *J Lipid Res* 1978, 19: 863-871.
- 李 志雄, 岩森正男, 永井克孝, 設楽信行, 高倉 公朋. グリオーマ培養細胞のスフィンゴ糖脂質組成および neuraminidase 処理による影響. *脳神経* 1989, 41: 347-352.
- Fredman P, Holst HV, Collins VP, Granholm L, Svennerholm L. Sialyllactotetraosylceramide, a ganglioside marker for human malignant gliomas. *J Neurochem* 1988, 50: 912-919.
- Berra B, Gaini SM, Riboni L. Correlation between ganglioside distribution and histological grading of human astrocytomas. *Int J Cancer* 1985, 36: 363-366.
- Ando S. Gangliosides in the nervous system. *Neurochem Int* 1983, 5: 507-537.
- Manuelidis L, Yu RK, Manuelidis EE. Ganglioside content and pattern in human gliomas in culture. *Acta Neuropathol (Berl)* 1977, 38: 129-135.
- Gilliard BK, Thurmon LT, Marcus DM. Intracellular distribution of glycosphingolipids: colocalization of glycosphingolipids with intermediate filaments. *Cell Motil Cytoskeleton* 1992, 21: 255-271.
- Kawashima I, Nakamura O, Tai T. Antibody responses to ganglio-series gangliosides in different strains of mice. *Mol Immunol* 1992, 29: 625-632.
- Nores GA, Dohi T, Taniguchi M, Hakomori S. Density-dependent recognition of cell surface GM3 by a certain anti-melanoma antibody, and GM3 lactone as a possible immunogen: requirements for tumor-associated antigen and immunogen. *J Immunol* 1987, 139: 3171-3176.
- Lloyd KO, Gordon CM, Thampoe IJ, DiBenedetto C. Cell surface accessibility of individual gangliosides in malignant melanoma cells to antibodies is influenced by the total ganglioside composition of the cells. *Cancer Res* 1992, 52: 4948-4953.
- Hakomori S, Kannagi R. Glycosphingolipids as tumor-associated and differentiation markers. *J Natl Cancer Inst* 1983, 71: 231-251.

27. Kannagi R, Stroup R, Cochran NA, Urdal DL, Young WW Jr., Hakomori S. Factors affecting expression of glycolipid tumor antigens: influence of ceramide composition and coexisting glycolipid on the antigenicity of gangliosylceramide in murine lymphoma cells. *Cancer Res* 1983, 43: 4997-5005.
28. Urdal DL, Hakomori S. Characterization of tumor-associated ganglio-*N*-triaosylceramide in mouse lymphoma and the dependency of its exposure and antigenicity on the sialosyl residues of a second glycoconjugate. *J Biol Chem* 1983, 258: 6869-6874.
29. Kuhns WJ, Bramson S. Variable behaviour of blood group H on HeLa cell populations synchronized with thymidine. *Nature* 1968, 219: 938-939.
30. Sakiyama H, Takahashi T, Hirabayashi Y, Taniguchi M. Change in the topographical distribution of GM3 during cell spreading and growth: immunostaining with monoclonal antibody against GM3. *Cell Struct Funct* 1987, 12: 93-105.
31. Gahmberg CG, Hakomori S. Surface carbohydrates of hamster fibroblasts. *J Biol Chem* 1975, 250: 2438-2446.

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学医学部附属病院脳神経外科学講座 前田義裕